

METHOD, DEVICE, AND PROGRAM FOR FLUORESCENCE INTENSITY CORRECTION, AND MEDIUM STORING THE PROGRAM

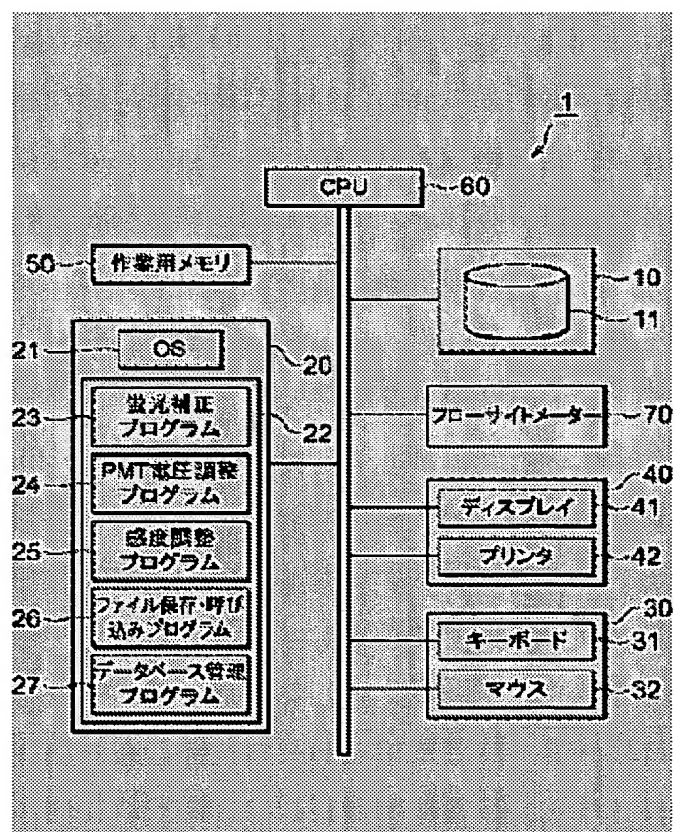
Patent number: JP2003083894
Publication date: 2003-03-19
Inventor: NAKADA MOTOKI
Applicant: SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES
Classification:
- international: G01N21/64; G01N15/14; G01N33/48; G01N33/58
- european:
Application number: JP20010280411 20010914
Priority number(s): JP20010280411 20010914

Report a data error here

Abstract of JP2003083894

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method, a device and a program for fluorescence intensity correction, and a medium storing the program, enabling fluorescence intensity correction involving a plurality of fluorescent pigments or fluorescence-measuring laser beams and also enabling fluorescence intensity correction even when specimen cell measurement is complete.

SOLUTION: The method for fluorescence intensity correction is equipped, as shown in the 2D correlation diagram indicating fluorescent images of fluorescence-marked specimen cells obtained by a flow cytometer, with the center-of-gravity value calculation step where the center-of-gravity value is calculated for the florescent group relative to the fluorescence-marked specimen cells, the fluorescence intensity calculation step where the true fluorescence intensity [FLt] is calculated by operating $[FLt] = [A] * [FLm]$ by using the fluorescence matrix [FLm] obtained from fluorescence intensity of the specimen cells corresponding to the center-of-gravity value and the matrix [A] memorized beforehand, and the fluorescence intensity outputting step where the true fluorescence intensity [FLt] is output. The device and program for fluorescence intensity correction embody the correction method.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-83894

(P2003-83894A)

(43)公開日 平成15年3月19日(2003.3.19)

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テ-グ-ト*(参考)
G 0 1 N 21/64 15/14		G 0 1 N 21/64 15/14	F 2 G 0 4 3 B 2 G 0 4 5 C D M
33/48		33/48	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-280411(P2001-280411)

(22)出願日 平成13年9月14日(2001.9.14)

(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願(平成12年度新エネルギー、産業技術総合開発機構、医療、福祉機器技術研究開発微量細胞情報検出システム委託研究、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)

(71)出願人 000002130

住友電気工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72)発明者 中田 元己

大阪府大阪市此花区島屋一丁目1番3号

住友電気工業株式会社大阪製作所内

(74)代理人 100088155

弁理士 長谷川 芳樹 (外3名)

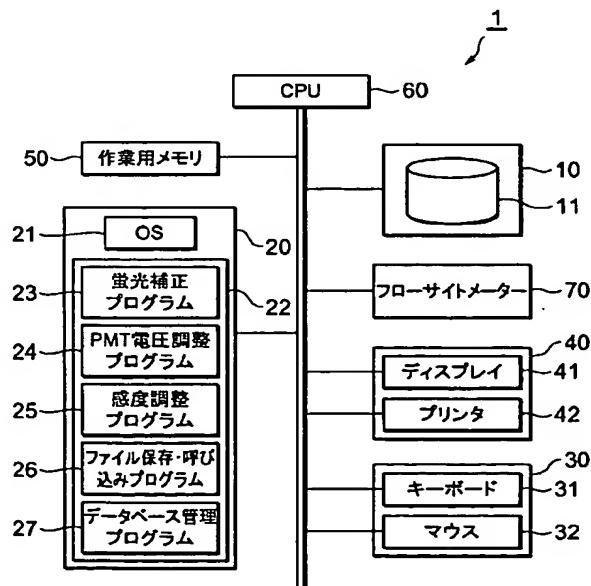
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 蛍光値補正方法、蛍光値補正装置、蛍光値補正プログラム及び前記蛍光値補正プログラムを記録した記録媒体

(57)【要約】

【課題】 複数の蛍光色素間や、複数のレーザー光を用いて蛍光の測定を行う際にも蛍光補正が可能であり、被験細胞の測定処理が終了した後も蛍光補正を実施することが可能である蛍光値補正方法、蛍光値補正装置、蛍光値補正プログラム及び当該プログラムを記録した記録媒体を提供すること。

【解決手段】 フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出ステップと、前記重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値から得られる蛍光行列[FLm]と、予め記憶された行列[A]'とを用いて、[FLt]=[A]'*[FLm]を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出ステップと、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力ステップと、を備えることを特徴とする蛍光値補正方法、及び前記補正方法を実現する蛍光値補正装置並びに蛍光値補正プログラム。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出ステップと、前記重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値から得られる蛍光行列[FLm]と、予め記憶された行列[A]'とを用いて、 $[FLt] = [A]' * [FLm]$ を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出ステップと、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力ステップと、を備えることを特徴とする蛍光値補正方法。

【請求項 2】 前記フローサイトメーターの光電子倍增管(PMT)の電圧を調整するPMT電圧調整ステップと、光電子倍增管、フォトダイオード及び蛍光の感度を調整する感度調整ステップと、をさらに備えることを特徴とする請求項 1 に記載の蛍光値補正方法。

【請求項 3】 前記重心値算出ステップにおいて、蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を手動で算出することを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の蛍光値補正方法。

【請求項 4】 フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図に関する情報の入力を受け付ける入力手段と、前記二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出手段と、前記重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値から得られる蛍光行列[FLm]と、予め記憶された行列[A]'とを用いて、 $[FLt] = [A]' * [FLm]$ を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出手段と、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力手段と、を備えることを特徴とする蛍光値補正装置。

【請求項 5】 前記フローサイトメーターの光電子倍增管(PMT)の電圧を調整するPMT電圧調整手段と、光電子倍增管、フォトダイオード及び蛍光の感度を調整する感度調整手段と、前記蛍光値算出手段で算出された蛍光値[FLt]、前記電圧調整手段で調整された光電子倍增管の電圧値及び前記感度調整手段で調整された光電子倍增管、フォトダイオード並びに蛍光の感度値を保存する保存手段と、をさらに備えることを特徴とする請求項 4 に記載の蛍光値補正装置。

【請求項 6】 フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図に関する情報の入力を受け付ける入力手段と、前記入力手段で入力された二次元相関図に関する情報を記憶する記憶手段と、少なくとも前記記憶手段に記憶された情報をもとに得られた蛍光値補正情報を出力する出力手段とを備えるコンピュータにおいて、

前記コンピュータを、前記記憶手段に記憶された二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値を算出する重心値算出手段と、前記重心値から得られる蛍光行列[FLm]と、予め記憶された行列[A]'とを用いて、 $[FLt] = [A]' * [FLm]$ を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出手段と、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力手段と；して機能させるための蛍光値補正プログラム。

10 【請求項 7】 前記コンピュータを、前記フローサイトメーターの光電子倍增管(PMT)の電圧を調整するPMT電圧調整手段と、光電子倍增管、フォトダイオード及び蛍光の感度を調整する感度調整手段と、前記蛍光値算出手段で算出された蛍光値[FLt]、前記電圧調整手段で調整された光電子倍增管の電圧値及び前記感度調整手段で調整された光電子倍增管、フォトダイオード並びに蛍光の感度値を保存する保存手段と；して機能させるためのプログラムをさらに備えることを特徴とする請求項 5 に記載の蛍光値補正プログラム。

20 【請求項 8】 フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図に関する情報の入力を受け付ける入力手段と、前記入力手段で入力された二次元相関図に関する情報を記憶する記憶手段と、少なくとも前記記憶手段に記憶された情報をもとに得られた蛍光値補正情報を出力する出力手段と、コンピュータで読み取り可能な媒体から情報を読み出す読み出し手段とを備えるコンピュータと共に用いるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体であって、前記プログラムが請求項 6 又は 7 に記載の蛍光値補正プログラムであることを特徴とするコンピュータ読み取り可能な記録媒体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、フローサイトメーターで得られた蛍光標識被験細胞の蛍光情報をコンピュータによって補正する、蛍光値補正方法、蛍光値補正装置、蛍光値補正プログラム及び当該プログラムを記録した記録媒体に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞の表面には、細胞の種類に応じて多種のタンパク質(以下、「細胞表面分子」という)が存在する。これらの細胞表面分子は、ある種の疾患(例えば、白血病等の癌や、リウマチ等の自己免疫疾患)では、発症時と非発症時で細胞表面分子の発現量や発現する細胞表面分子の種類が異なることから、細胞表面分子の検出や発現量の測定に対する要望は多い。

50 【0003】このような細胞表面分子を測定する方法と

して、現在、最もよく利用されている方法がフローサイトメトリーである。フローサイトメトリーとは、細胞の浮遊液をフローサイトメーターにより高速で流し、その細胞にレーザー光を照射することによって細胞表面分子を検出する方法である。また、フローサイトメーターは、毎秒数百個～数万個の細胞の浮遊液にレーザー光を照射し、照射によって細胞から発する散乱光及び数種の蛍光（予め細胞に標識しておいた蛍光色素がレーザー光によって励起されて発した光）を同時に検出することができ、このようにして得られた光の信号は電気信号に変換され、最終的にコンピュータ上で個々の細胞の情報を表示させることにより種々の細胞表面分子の情報を測定する。ここで、フローサイトメーターにおいて、細胞への蛍光色素の標識は、細胞表面分子に特異的な蛍光色素標識抗体を細胞表面分子に反応させることによって行われる。

【0004】現在、実用化されているフローサイトメーターでは、同時に6色までの蛍光を検出することが可能となっており、一度の測定で同一の細胞表面に存在する複数の分子を解析することができる。

【0005】一方、現在利用されている蛍光色素（例えば、FITC、PE（フィコエリスリン）、APC（アロフィコシアニン））は、最大蛍光波長が近接しており、蛍光スペクトルを比較した場合に重なりが見られる波長域が存在する。通常、このような重なりを最小限にするために光学フィルターを用いているが、これだけでは蛍光色素間の重なりを全て除くことができず、目的としない蛍光色素の検出器への漏れ込みに対して電気的な補正が必要であった。すなわち、現在のフローサイトメーターには、信号処理回路上でこのような蛍光補正を行

っている。

【0006】しかしながら、信号処理回路上での補正では、複数のレーザーを使用して多数の蛍光色素の蛍光を検出する場合に、同一レーザーによって励起された蛍光間の補正は可能であるが、異なるレーザーによる励起蛍光間の補正は不可能であるという問題があった。

【0007】また、同一レーザーによる励起蛍光間の補正の場合でも、同時に3種以上の蛍光色素に対する補正は不可能であるという問題があった。

【0008】さらに、このような蛍光補正は、装置の信号処理回路上で蛍光補正を実施するため、一度その補正值を入力しデータを取得した後は、再度同一データを補正することは不可能であり、再度サンプルを調製して測定し直す必要があるという問題があった。

【0009】また、技術開発が進むに連れて使用可能な蛍光色素の数も増加の傾向があり、複数の蛍光色素間の補正の重要性が高まっていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記従来技術の有する課題に鑑みてなされたものであり、複数の蛍光

色素間や、複数のレーザー光を用いて蛍光の測定を行う際にも蛍光補正が可能であり、被験細胞の測定処理が終了した後も蛍光補正を実施することが可能である蛍光値補正方法、蛍光値補正装置、蛍光値補正プログラム及び当該プログラムを記録した記録媒体を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の二次元相関図から当該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出し、重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値と所定の行列式を用いて蛍光値の補正計算を行うようなプログラムを開発することにより、複数の蛍光色素間や、複数のレーザー光を用いて蛍光の測定を行う際にも蛍光補正が可能であり、また、被験細胞の測定処理が終了した後も試料の再調製を行うことなく蛍光補正を実施することが可能であることを見出し、本発明を完成した。

【0012】すなわち、本発明の蛍光値補正方法は、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出ステップと、前記重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値から得られる蛍光行列[FLm]と、予め記憶された行列[A]'とを用いて、 $[FLt] = [A]' * [FLm]$ を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出ステップと、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力ステップと、を備える。

【0013】また、本発明の蛍光値補正方法は、前記蛍光値補正方法に加えて、前記フローサイトメーターの光電子倍增管（PMT）の電圧を調整するPMT電圧調整ステップと、光電子倍增管、フォトダイオード及び蛍光の感度を調整する感度調整ステップと、をさらに備えていてもよい。このようなステップを備えることにより、より簡便に光電子倍增管の電圧、光電子倍增管及びフォトダイオードの蛍光感度を調整することが可能となる傾向にある。

【0014】さらに、本発明の蛍光値補正方法は、前記重心値算出ステップにおいて、蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の集まりを等高線表示し、その頂上を重心値として選択すればよい。また、ディスプレイに表示された蛍光集団を目視しながら重心と認められる任意の点を指定し、重心値としてもよい。このように手で重心値を指定することにより、蛍光集団が均一ではなく、比較的広範囲に渡って存在する場合等に、より迅速な重心値の測定ができる。

【0015】また、本発明の蛍光値補正装置は、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図に関する情報の入力を受け付ける入力手段と、前記二次元相関図において、該蛍

10

20

30

40

50

光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出手段と、前記重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値から得られる蛍光行列[FLm]と、予め記憶された行列[A]'を用いて、 $[FLt] = [A]' * [FLm]$ を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出手段と、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力手段と、を備える。また、本発明の蛍光値補正装置は、前記蛍光値補正装置に加えて、前記フローサイトメーターの光電子倍增管(PMT)の電圧を調整するPMT電圧調整手段と、光電子倍增管、フォトダイオード及び蛍光の感度を調整する感度調整手段と、前記蛍光値算出手段で算出された蛍光値[FLt]、前記電圧調整手段で調整された光電子倍增管の電圧値及び前記感度調整手段で調整された光電子倍增管、フォトダイオード並びに蛍光の感度値を保存する保存手段と、をさらに備えていてもよい。このようなステップを備えることにより、より簡便に光電子倍增管の電圧、光電子倍增管及びフォトダイオードの蛍光感度を調整することが可能となる。

【0016】また、本発明の蛍光値補正プログラムは、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図に関する情報の入力を受け付ける入力手段と、前記入力手段で入力された二次元相関図に関する情報を記憶する記憶手段と、少なくとも前記記憶手段に記憶された情報をもとに得られた蛍光値補正情報を出力する出力手段とを備えるコンピュータにおいて、前記コンピュータを、前記記憶手段に記憶された二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値に該当する蛍光標識被験細胞の蛍光値を算出する重心値算出手段と、前記重心値から得られる蛍光行列[FLm]と、予め記憶された行列[A]'を用いて、 $[FLt] = [A]' * [FLm]$ を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出手段と、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力手段と；して機能させる。

【0017】さらに、本発明の蛍光値補正プログラムは、前記蛍光値補正プログラムに加えて、前記コンピュータを、前記フローサイトメーターの光電子倍增管(PMT)の電圧を調整するPMT電圧調整手段と、光電子倍增管、フォトダイオード及び蛍光の感度を調整する感度調整手段と、前記蛍光値算出手段で算出された蛍光値[FLt]、前記電圧調整手段で調整された光電子倍增管の電圧値及び前記感度調整手段で調整された光電子倍增管、フォトダイオード並びに蛍光の感度値を保存する保存手段と；して機能させるためのプログラムをさらに備えていてもよい。このようなステップを備えることにより、より簡便に光電子倍增管の電圧、光電子倍增管及びフォトダイオードの蛍光感度を調整することが可能となる傾向にある。

【0018】また、本発明の記録媒体は、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図に関する情報の入力を受け付け

る入力手段と、前記入力手段で入力された二次元相関図に関する情報を記憶する記憶手段と、少なくとも前記記憶手段に記憶された情報をもとに得られた蛍光値補正情報を出力する出力手段と、コンピュータで読み取り可能な媒体から情報を読み出す読み出し手段とを備えるコンピュータと共に用いるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体であって、前記プログラムが上記の蛍光値補正プログラムであることを特徴とするコンピュータ読み取り可能な記録媒体である。

【0019】

【発明の実施の形態】以下、場合により図面を参照しつつ本発明の好適な実施形態について詳細に説明する。

【0020】まず、本発明の蛍光値補正方法について説明する。本発明の蛍光値補正方法は、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出ステップと、前記重心値から得られる蛍光行列[FLm]を、予め記憶された行列[A]'を用いて、 $[FLt] = [A]' * [FLm]$ を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出ステップと、前記蛍光値[FLt]を出力する蛍光値出力ステップと、を備える。

【0021】本発明の実施形態にかかる蛍光値補正方法には、例えば、蛍光値補正装置1が用いられる。図1に示すように、まず、フローサイトメーター70から得られた蛍光標識被験細胞の細胞表面分子にかかる情報がディスプレイ41等に表示される。次に、前記情報に基づいて、オペレーティングシステム(OS)21の制御の下でフローサイトメーターの情報を画面に表示したり、各種信号処理回路の電圧値、PMT電圧値等を制御するプログラムが起動し、当該プログラムによりディスプレイ41に表示される。次に、同じOSの制御下で蛍光補正プログラム23が起動され、さらに、ファイル保存・呼び込みプログラム26及びデータベース管理プログラム27が起動される。

【0022】まず、本発明にかかるフローサイトメーターによる被験細胞の検出について説明する。フローサイトメーターは、細胞や微生物等の均一な浮遊液より、浮遊物の光学特性を測定する機器である。前記浮遊物は、液流に乗ってレーザー光の焦点を通過する際に毎秒500~4000個の浮遊物より、前方散乱光、側方散乱光、蛍光等の光学特性を個々の浮遊物について同時に測定し、それらの大きさ、内部構造、細胞膜、核内に存在する種々の抗原、核酸等の生物学的特性を測定するものである。

【0023】通常、被験細胞の細胞表面分子を検出するには、被験細胞を含む試料と、当該被験細胞の細胞表面分子に対する蛍光標識されたモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体を混合して細胞表面分子に前記2種の抗体が結合した蛍光標識被験細胞を調製した後、フローサイトメーターに供する。ここで、前記抗体に結合する

10

20

30

40

50

蛍光色素としては、フローサイトメーターによって検出可能なものであれば特に限定されず、例えば、フィコエリスリン (PE)、FITC、PE-Cy5、PE-Cy7、PE-テキサスレッド(PE-Texas red)、アロフィコシアニン (APC)、APC-Cy7、エチジウムブロマイド (Ethidium bromide)、プロピジウムアイオダイド (Propidium iodide)、ヘキスト (Hoechst) 33258/33342、DAPI、アクリジンオレンジ (Acridine orange)、クロモマイシン (Chromomycin)、ミトラマイシン (Mithramycin)、オリボマイシン (Olivomycin)、パイロニン (Pyronin) Y、チアゾールオレンジ (Thiazole orange)、ローダミン (Rhodamine) 101イソチオシアネート (isothiocyanate)、BCECF、BCECF-AM、C. SNARF-1、C. SNARF-1-AMA、エクオリン (Aequorin)、Indo-1、Indo-1-AM、Fluo-3、Fluo-3-AM、Fura-2、Fura-2-AM、オキソノール (Oxonol)、テキサスレッド (Texas red)、ローダミン (Rhodamine) 123、10-N-ノニ-アクリジンオレンジ (Acridine orange)、フルオレセイン (Fluorescein)、フルオレセインジアセテート (Fluorescein diacetate)、カルボキシフルオレセイン (Carboxyfluorescein)、カルボキシフルオレセインジアセテート (Carboxyfluorescein diacetate)、カルボキシジクロロフルオレセイン (Carboxydichlorofluorescein)、カルボキシジクロロフルオレセインジアセテート (Carboxydichlorofluorescein diacetate) が挙げられる。

【0024】フローサイトメーターで検出する際に用いる蛍光標識抗体は、抗体に直接前記蛍光色素を結合させてもよいし、抗体にはビオチンを標識しておき、蛍光色素にはアビジンを結合させておき、アビジン・ビオチン反応により蛍光標識抗体を調製してもよい。

【0025】このようにして蛍光標識された被験細胞は、通常当業者が行う公知の方法によって、フローサイトメーターによって検出すればよい。

【0026】次に、第2記録装置20に記録された自動蛍光補正プログラム22及び第1記録装置10に記録された自動蛍光補正測定フォルダ11について順に説明する。

*

$$FL(1)t = FL(1)m \cdot A_{11} \cdot FL(1)t \cdot A_{12} \cdot FL(2)t \cdot A_{21} \cdot FL(3)t \cdots A_{1n} \cdot FL(n)t$$

$$FL(2)t = FL(2)m \cdot A_{21} \cdot FL(1)t \cdot A_{22} \cdot FL(2)t \cdot A_{23} \cdot FL(3)t \cdots A_{2n} \cdot FL(n)t$$

$$FL(3)t = FL(3)m \cdot A_{31} \cdot FL(1)t \cdot A_{32} \cdot FL(2)t \cdot A_{33} \cdot FL(3)t \cdots A_{3n} \cdot FL(n)t$$

:

$$FL(n)t = FL(n)m \cdot A_{n1} \cdot FL(1)t \cdot A_{n2} \cdot FL(2)t \cdot A_{n3} \cdot FL(3)t \cdots A_{nn} \cdot FL(n-1)t$$

で表される連立一次方程式を立てることができる。

【数1】

【0031】前記式をマトリックスで考えると、

* 【0027】自動蛍光補正プログラム22は、蛍光補正プログラム23から構成されており、必要に応じて更に、PMT電圧調整プログラム24、感度調整プログラム25、ファイル保存・呼び込みプログラム26及びデータベース管理プログラム27を備えていてもよい。

【0028】蛍光補正プログラム23は、フローサイトメーター70から得られた蛍光標識被験細胞の細胞表面分子の情報を反映した二次元相関図上に出現する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出ステップと、前記重心値から得られる蛍光行列[FLm]を、予め記憶された行列[A]'を用いて、[FLt]=[A]'*[FLm]を計算し、真の蛍光値[FLt]を算出する蛍光値算出ステップとを備える。また、蛍光補正プログラム23は、前記真の蛍光値をフローサイトメーターのハードウェア (信号処理回路) に与え、その値に基づいてフローサイトメーターを設定するステップをさらに備える。以下に、蛍光補正プログラム23の実行によって行われる処理について説明する。

【0029】フローサイトメーター70から得られた蛍光検出器にかかる二次元相関図は、例えば、図8Aのようなパターンを示す。この場合の蛍光集団2の重心値は、ドット表示から等高線表示へとグラフ表示パターンを切り換え、等高線表示により各集団の頂点を導き出すことにより求められる。ここで、等高線表示とは、相関図を複数の区画 (例えば、縦横それぞれ1024ずつに分割して合計1048576の区画) に分割し、1区画あたりのデータ数 (画面上での点の数) が等しい区間を線で結んで等高線表示したものである。また、本発明の蛍光値補正方法において、前記蛍光集団の重心値を求める方法としては、前述したようなソフトウェアによる方法の他に、ディスプレイ41等に表示された蛍光集団から目視によってユーザーが重心であると判断する任意の点を選択して重心値を求めてもよい。ただし、この重心値が不適当である場合には最終的な補正が不十分となるが、その場合には再度以上の操作を繰り返すことにより重心値を求めればよい。

【0030】このようにして求められた重心値における蛍光値をFLmとし、当該重心値における真の蛍光値をFLtとし、() 内を蛍光色素のナンバーとすると、

$$\begin{array}{c} 9 \\ \left[\begin{array}{c} FL(1)_m \\ FL(2)_m \\ FL(3)_m \\ \vdots \\ FL(n)_m \end{array} \right] = \left[\begin{array}{cccccc} 1 & A_{12} & A_{13} & A_{14} & \cdots & A_{1n} \\ A_{21} & 1 & A_{23} & A_{24} & \cdots & A_{2n} \\ A_{31} & A_{32} & 1 & A_{34} & \cdots & A_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ A_{n1} & A_{n2} & A_{n3} & A_{n4} & \cdots & 1 \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} FL(1)_t \\ FL(2)_t \\ FL(3)_t \\ \vdots \\ FL(n)_t \end{array} \right] \end{array} \quad \cdots (1)$$

となる。

【0032】ここで、式(1)は、

$$[FL_m] = [A] * [FL_t] \quad \cdots (2)$$

と表すことができ、真の蛍光値 $[FL_t]$ を求めるには、 $[A]$ 10
の逆行列を左から掛け、

$$[FL_t] = [A]^{-1} * [FL_m] \quad \cdots (3)$$

と表すことができる。

【0033】すなわち、 $[FL_m]$ はフローサイトメーター
による測定値であるので、 $[A]$ を任意に設定することによ
り $[FL_t]$ を算出することができる。従って、例えば、
蛍光色素が2種類の2カラー蛍光補正の場合では、式
(2)より、

【数2】

$$\left[\begin{array}{c} FL(1)_m \\ FL(2)_m \end{array} \right] = \left[\begin{array}{cc} 1 & A_{12} \\ A_{21} & 1 \end{array} \right] \left[\begin{array}{c} FL(1)_t \\ FL(2)_t \end{array} \right] \quad \cdots (4) \quad 20$$

となる。

【0034】このような関係式より、上記の図8Aに示
される蛍光集団2及び3の蛍光値を補正し、真の蛍光値
を算出することは、図8Aにおける蛍光集団1と蛍光集
団2とを結ぶ直線を蛍光集団1を中心としてy軸と平行
な状態に移動し、蛍光集団1と蛍光集団3とを結ぶ直線
を蛍光集団1を中心としてx軸と平行な状態に移動する
ことに他ならない。このような状態は、

$$FL_{10} = FL_{20} \quad \cdots (5)$$

$$FL_{20} = FL_{10} \quad \cdots (6)$$

(ただし、添え字0はブランクを示す)で表され、式

(5)及び式(6)を式(4)に代入すると、ブランク
ポイントに対して、

$$FL_{10} = FL_{10} + A_{12} FL_{20} \quad \cdots (7)$$

$$FL_{20} = FL_{20} + A_{21} FL_{10} \quad \cdots (8)$$

FL1ポイントに対して、

$$FL_{11} = FL_{11} + A_{12} FL_{20} \quad \cdots (9)$$

$$FL_{21} = FL_{20} + A_{21} FL_{11} \quad \cdots (10)$$

FL2ポイントに対して、

$$FL_{12} = FL_{10} + A_{12} FL_{22} \quad \cdots (11)$$

$$FL_{22} = FL_{21} + A_{21} FL_{12} \quad \cdots (12)$$

の式を得ることができる。

【0035】これら式(7)～式(12)において、未
知数は、 A_{12} 、 A_{21} 、 FL_{10} 、 FL_{20} 、 FL_{11} 、 FL_{21} である
ため、連立方程式を解くことで係数値 A_{12} 及び A_{21} を算出
することができる。従って、式(4)における $[FL_t]$ を
算出することができ、前記蛍光集団の真の蛍光値が算出
される。

【0036】以下に、本発明にかかる蛍光補正プログラ
ム23の処理を図3に示すフローチャートに従って説明
する。S31は蛍光標識された蛍光標識被験細胞をフロ
ーサイトメーターに流し、その結果得られたFSC及び
SSCの二次元相関図、並びに、標識に用いられた蛍光
色素(FL1～FL6)の蛍光強度にかかる二次元相関
図を示す。これらの二次元相関図はディスプレイ41等
の出力装置又はフローサイトメーターに附属のディス
プレイに表示されている。FL1～FL6にかかる二次元
相関図は、例えば、2カラーの蛍光色素を使用した場合
にはFL1及びFL2をそれぞれx軸又はy軸としたグラ
フとして表される。このようなグラフ上には、検出さ
れた蛍光色素によって形成される複数の蛍光集団が出現
しているが、S32ではこのような複数の蛍光集団それ
ぞれについて重心値が求められる。求められた重心値の
蛍光値は、S33において上述したような行列計算に基
づいて補正計算され、真の蛍光値が算出される。こうし
て算出された蛍光補正值は、S34において、フローサ
イトメーターのハードウェア(信号処理回路)に与えら
れるとともに、蛍光補正プログラム23の補正值の欄に
記録される。

【0037】次に、本発明にかかるPMT電圧調整プロ
グラム24の実行によって行われる処理について説明す
る。PMT電圧調整プログラム24を実行することによ
り、SSC(側方散乱光: Side Scatter)及びFL1～
FL6に関するPMT(光電子倍增管: Photomultiplier)
の電圧、Lin(リニア)/Log(ログ)の切り
替え及びゲイン調整を行うことが可能となる。ここで、
フローサイトメーターにおいて、通常、SSC及びFL
1～FL6の検出にはPMTを用い、細胞がレーザーを
横切ったときに発生する光信号を検出している。フロー
サイトメーターで検出した光信号を電気信号に変換する
際に、検出器(ここではPMT)の電圧を調整すること
により電気信号の増幅又は減幅が可能であり、その後さ
らにアンプで微調整が可能である。アンプの設定には、
通常、アンプモードの選択及びアンプゲインの調整が必
要であり、アンプモードはLin又はLogのいずれかの
モードを選択することにより行う。PMT電圧調整プ
ログラム24の実行によって、PMT電圧の調整が可能
であると共に、Lin及びLogの2モードの切り替え
処理が可能である。また、PMT電圧調整プログラム2
4の実行によって前記アンプゲインの調整も可能であ
る。

【0038】以下に、本発明にかかるPMT電圧調整プ

11

ログラム24の処理を図4に示すフローチャートに従って説明する。S41では、フローサイトメーターに流す蛍光標識されたビーズ（ブランクの場合はビーズのみ）のデータを入力する。S41で入力されたデータに基づいてS42では、検出された蛍光のFSC及びSSCの二次元相関図、並びに、標識に用いられた蛍光色素（FL1～FL6）の蛍光強度にかかる二次元相関図を取得しS43に進む。S43では、前記2種類の二次元相関図における相関図上の細胞集団の位置が把握され、S44に進む。S44では、S41で入力されたビーズのデータとS43で把握されたデータとを照合し、FSC及びSSCにかかる二次元相関図上で適した位置に細胞集団が存在しているかどうかを判断し、適した位置に存在している場合にはS46に進み、適した位置に存在していない場合にはS45に進む。S45ではFSC及びSSCの値を調整し、再びS43に進み、S44で適した位置に存在していると判断されるまでFSC及びSSCの値の調整を行う。S46では、蛍光強度にかかる二次元相関図におけるバックグラウンドの細胞集団の位置を把握し、S47に進む。S47ではS41で入力されたビーズのデータとS46で把握されたデータとを照合してこれらのデータが同一であるか否かを判断する。同一であると判断された場合にはS49に進み、同一でないと判断された場合にはS48に進む。S48では、FL1～FL6のPMT電圧値を調整し、再びS46に進み、S47で同一であると判断されるまでFL1～FL6のPMT電圧値の調整を行う。S49では、調整が完了した適正なPMT電圧値を設定する。

【0039】次に、感度調整プログラム25の実行によって行われる処理について説明する。感度調整プログラム25を実行することにより、フローサイトメーターにおけるFSC（前方散乱光：Forward Scatter）、SSC及びFL1～FL6の蛍光検出器の感度調整を行うことが可能となる。

【0040】FSCの感度調整は、テストパルスを用いてFSCのスレッシュホールドを徐々に低下させ、FSC上に発生するノイズを検出して、その後、スレッシュホールドをその数値に設定してビーズを取り込み、ビーズの信号とFSCノイズの分離度を測定することにより行う。ここで、前記ビーズは、例えば、2 μ m、6 μ m、10 μ mのものを同時に取り込むことにより行うことができる。

【0041】SSCの感度調整は、FSCに電気的なパルスが発生させた後、SSCで検出されるバックグラウンド信号をSSCのノイズとして判断し、その後、例えば、6 μ mのビーズを取り込み、SSCのビーズの信号とノイズの分離度を測定することにより行うことができる。

【0042】蛍光感度調整は、蛍光標識ビーズと未標識ビーズの混合ビーズを取り込んだ後、蛍光標識ビーズと

12

未標識ビーズの分離度を測定することにより行うことができる。

【0043】以下に、本発明にかかる感度調整プログラム25の処理を図5に示すフローチャートに従って説明する。S51では、フローサイトメーターに流す蛍光標識されたビーズ（ブランクの場合はビーズのみ）のデータを入力する。S51で入力されたデータに基づいてS52では検出された蛍光データが取得されS53に進む。S53では、FSC及びSSCの二次元相関図、並びに、標識に用いられた蛍光色素（FL1～FL6）の蛍光強度にかかる二次元相関図が取得されS54に進む。S54では、FSC及びSSCの二次元相関図、並びに、標識に用いられた蛍光色素（FL1～FL6）の蛍光強度にかかる二次元相関図のバックグラウンド値及び蛍光値集団値を把握し、S55に進む。S55では、S54で得られた蛍光値集団値がS51で入力されたビーズのデータと一致するかどうか判断され、一致すると判断された場合にはS57に進み、一致しないと判断された場合にはS56に進む。S56では、PMT電圧値が調整され、再びS53に進む。S55で一致すると判断されるまでPMT電圧値の調整を行う。S57では、最終的なPMT電圧値を設定する。

【0044】次に、ファイル保存・呼び込みプログラム26の実行によって行われる処理について説明する。ファイル保存・呼び込みプログラム26を実行することにより、蛍光補正後の補正值及びPMT電圧調整後のPMT電圧値を自動蛍光補正測定フォルダ11に記録することが可能となる。また、自動蛍光補正測定フォルダ11に記憶された蛍光補正值及びPMT電圧値は、当該プログラムによって自動蛍光補正測定フォルダ11から呼び出すことができ、この値を元にフローサイトメーター70の蛍光補正及びPMT電圧の調整を行うことが可能である。また、当該プログラムによれば、前記蛍光補正值及びPMT電圧の調整電圧値をディスプレイ41等の出力装置の任意の位置に出力すること可能となる。

【0045】以下に、本発明にかかるファイル保存・呼び込みプログラム26の処理を図6に示すフローチャートに従って説明する。図6(a)にファイル保存プログラムの処理を示す。S61ではファイル保存のボタンを選択し、S62に進む。S62では、保存するファイルの名称を入力し、S63に進む。S63では、前記ファイルにデータを保存する。ここで、当該データとしては、蛍光信号データであるFCSファイル、蛍光補正值及びPMT電圧の調整電圧値データであるsetファイル、グラフ表示画面であるexpファイルがあり、これら全てのファイルを保存してもよいし、所望のファイルのみを保存してもよい。また、図6(b)にファイル呼び込みプログラムの処理を示す。S64では、ファイル読み込みボタンを選択し、S65に進む。S65では、呼び込みファイルの形式を選択し、S66に進む。こ

で、ファイルの形式とは、前記ファイル保存プログラムで保存した FCS ファイル、set ファイル及び exp ファイルが該当する。S66 では、所望のファイル名を入力し、S67 に進む。S67 では、S66 で入力したファイル名を呼び出すことにより所望のファイルを取得することができる。

【0046】次に、データベース管理プログラム 27 の実行によって行われる処理について説明する。データベース管理プログラム 27 を実行することにより、自動蛍光補正測定 11 に記憶された蛍光補正值、PMT 電圧値等をサンプルの類別に応じたデータフォルダに分類して記憶し、サンプル名、色素名、使用した抗体、これらの製造元又は細胞種等の名称をキーワードとして検索可能なデータベースが生成される。

【0047】以下に、本発明にかかるデータベース管理プログラム 27 の処理を図 7 に示すフローチャートに従って説明する。S71 では、新規プロジェクト名を選択し、S72 に進む。S72 では、所望のプロジェクト名を入力し、S73 に進む。S73 では、S72 で入力されたプロジェクト名がついたファイル及びフォルダが作成され、当該フォルダ中に FCS ファイル、set ファイル及び exp ファイルが作成される。

【0048】次に、本発明の蛍光値補正装置について説明する。本発明の蛍光値補正装置は、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の二次元相関図に関する情報の入力を受け付ける入力手段と、前記二次元相関図において、該蛍光標識被験細胞に関する蛍光集団の重心値を算出する重心値算出手段と、前記重心値から得られる蛍光行列 $[FL_m]$ を、予め記憶された行列 $[A]'$ を用いて、 $[FL_t] = [A]' * [FL_m]$ を計算し、真の蛍光値 $[FL_t]$ を算出する蛍光値算出手段と、前記蛍光値 $[FL_t]$ を出力する蛍光値出力手段と、を備える。

【0049】図 1 は、本発明の実施形態にかかる蛍光値補正装置の構成を示すブロック図である。同図より、本実施形態の蛍光値補正装置 1 は、自動蛍光補正測定フォルダ 11 が記憶された記憶手段である第 1 記憶装置 10 と、オペレーティングシステム (OS) 21 及び自動蛍光補正プログラム 22 が記憶された第 2 記憶装置 20 と、自動蛍光補正プログラム 22 の実行において種々の条件の入力等を行うキーボード 31 及びマウス 32 を有する入力装置 30 と、フローサイトメトリの測定結果等を出力するディスプレイ 41 及びプリンタ 42 を有する出力装置 40、自動蛍光補正プログラム 22 の実行等を制御する CPU 60 とを備えており、これらはフローサイトメーター 70 と接続されている。

【0050】自動蛍光補正プログラム 22 は、フローサイトメーター 70 によって得られ、ディスプレイ 41 に表示されている蛍光標識被験細胞の二次元相関図に基づいて蛍光集団の重心値を算出し、その重心値から行列計算によって真の補正值を算出する蛍光補正プログラム 2

3 を備えている。また、自動蛍光補正プログラム 22 において、前記蛍光補正プログラム 23 に加えて、フローサイトメーター 70 の PMT の電圧を調整する PMT 電圧調整プログラム 24、FSC、SSC 及び蛍光感度の調整を行う感度調整プログラム 25、蛍光補正後の補正值及び PMT 電圧値等を自動蛍光補正測定フォルダ 11 に保存・呼び込みを行うファイル保存・呼び込みプログラム 26 と、蛍光補正值及び PMT 電圧値等をサンプルの類別に応じて保存されたデータフォルダを管理するデータベース管理プログラム 27 とを更に備えていてもよい。

【0051】入力装置 30 は、フローサイトメーター 70 によって得られ、ディスプレイ 41 に表示されている蛍光標識被験細胞の二次元相関図に基づいて、上記各種プログラムの実行に関する処理を行ったり、フローサイトメーター 70 の制御に関わるデータの入力を行う装置であり、具体的には、例えば、キーボード 31、マウス 32 が挙げられるが、フレキシブルディスク、CD-ROM、磁気テープ等の記録媒体を介して入力を受け付けることができる装置であってもよく、また遠隔地のコンピュータからネットワークを介して前記処理を行うための入力を受け付ける装置であってもよい。

【0052】出力装置 40 は、フローサイトメーター 70 によって得られた二次元相関図等の蛍光標識被験細胞にかかる解析情報はじめ、フローサイトメーター 70 の制御に関わるデータ等を出力するための装置であり、具体的には、例えば、ディスプレイ 41、プリンタ 42 が挙げられるが、フレキシブルディスク、CD-ROM、磁気テープ等の記録媒体を介して出力可能な装置であってもよい。

【0053】次に、図 2 に示したフローチャートに従って、蛍光値補正装置 1 内でのデータの流れを説明する。まず、ユーザーが蛍光標識被験細胞を準備し、フローサイトメーター 70 を用いて通常のフローサイトメトリの操作を行う。蛍光標識被験細胞をフローサイトメトリで処理することにより、FSC と SSC との二次元相関図及び使用した蛍光色素の蛍光検出器に関する二次元相関図がディスプレイ 41 等の出力装置に出力される。例えば、2 種の蛍光色素を用いてフローサイトメトリを実行した場合には、第 1 検出器によって検出された蛍光集団の蛍光強度を横軸に取り、第 2 検出器によって検出された蛍光集団の蛍光強度を縦軸に取った二次元相関図が出力される。通常、前記 FSC と SSC との二次元相関図には使用した蛍光色素の数に応じて所定の複数の蛍光集団が出現するが、ここで、FSC の感度調整及び PMT の電圧調整を行って FSC と SSC との二次元相関図の表示位置の調整を行ってもよい。この場合、入力手段 30 から入力された FSC の感度調整及び PMT の電圧調整にかかるデータはフローサイトメーター 70 に送られ、実際に調整が行われる。

【0054】次に、前記蛍光検出器に関する二次元相関図33上に示された複数の蛍光集団のそれぞれについて重心値データ34が算出される。得られた重心値データ34に基づいて、当該重心に該当する被験細胞の蛍光値データ35が求められる。この被験細胞の蛍光値データ35を元に、予め第1の記録装置10に記憶されている行列[A]'を用い、蛍光補正プログラム23の実行によって補正計算が行われ、真の蛍光値である補正済み蛍光値データ36が得られる。得られた補正済み蛍光値データは出力装置40に出力される。

【0055】次に、本発明のコンピュータ読み取り可能な記録媒体について説明する。本発明のコンピュータ読み取り可能な記録媒体は、フローサイトメーターによって得られた蛍光標識被験細胞の蛍光検出像を示した二次元相関図に関する情報の入力を受け付ける入力手段と、前記入力手段で入力された二次元相関図に関する情報を記憶する記憶手段と、少なくとも前記記憶手段に記憶された情報をもとに得られた蛍光値補正情報を出力する出力手段と、コンピュータで読み取り可能な媒体から情報を読み出す読み出し手段とを備えるコンピュータと共に用いるためのプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体であって、前記プログラムが、本発明の蛍光値補正プログラムであることを特徴とする。

【0056】前記記録媒体としては、コンピュータ読み取り可能な記録媒体であれば特に制限はないが、具体的には、例えば、フレキシブルディスクやCD-ROM等の円盤形記録媒体が用いられる。また、磁気テープ等のテープ型記録媒体を用いてもよい。

【0057】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。まず、全ての実施例に共通する使用ビーズ及び測定の方法について説明する。

【0058】（使用ビーズ）ビーズとしては、ビーズのみ（ブランク）の他、FITC（FL1）、PE（FL2）、PE-Cy5（FL3）、PE-Cy7（FL4）、APC（FL5）、APC-Cy7（FL6）それぞれの蛍光色素を3 μ m又は6 μ mのカルボキシルビーズを基に調製したものを使用した。

【0059】（測定の方法）全サンプルを混合したチューブをフローサイトメーターにセットし、蛍光補正なしの通常の測定を行った。このとき、手動でLog/Lin切り換え、PMT電圧、アンプ等の調整を行い、ブランクビーズと蛍光標識ビーズが二次元相関図のできるだけ両端に位置するように調整を行った。

【0060】実施例1～2

（2カラー蛍光補正）まず、サンプルチューブにブランクビーズ、FITCビーズ及びPEビーズを加えた。一方、データ収集画面上にて、FSC及びSSCの二次元相関図と、FL1及びFL2の二次元相関図を作成し

た。前記のサンプルをフローサイトメーターに流し、FSCのアンプゲイン及びSSCのPMT電圧電圧を調整し、FSC-SSC二次元相関図上のデータの表示位置の調整を行った。次に、FL1及びFL2の二次元相関図上でPMT電圧電圧を調整し、図8（a）のような位置に蛍光集団が収まるように設定した。

【0061】次に、図8（a）中の蛍光集団1、2及び3の重心値をそれぞれ求めた。すなわち、相関図を縦横それぞれ1024区画に分割して合計1048576の区画に分割し、1区画あたりのデータ数（画面上の点の数）が等しい区間を線で結んで等高線表示し、その頂点を重心とした。求められた重心値は、図8（b）のように重心値同士を直線（A、B）で結び、その後、直線Aがy軸と平行になるように蛍光集団1を中心として移動させ、直線Bがx軸と平行になるように（図8（c））蛍光集団1を中心として移動させるような以下の行列計算を行い、蛍光値の補正を行った。

FL1: FL1-25.0%FL2 ... (13)

FL2: FL2-1.5%FL1 ... (14)

【0062】また、前記重心値を求めるにあたり、ユーザーがディスプレイ上で重心と考えられる位置を指定し、同様に蛍光値の補正を行った（実施例2）。補正が終了して蛍光集団が図8（c）に示す状態になった場合の蛍光値を記憶した。

【0063】実施例3～4

（3カラー蛍光補正）

【0064】まず、サンプルチューブにブランクビーズ、FITCビーズ、PEビーズ及びPE-Cy5ビーズを加えた（実施例3）。ここで、PE-Cy5に代えてPerCPビーズを加えたものについても実施した（実施例4）。一方、データ収集画面上にて、FSC及びSSCの二次元相関図と、FL1及びFL2、FL2及びFL3、FL1及びFL3から得られた二次元相関図を作成した。前記のサンプルをフローサイトメーターに流し、FSCのアンプゲイン及びSSCのPMT電圧電圧を調整し、FSC-SSC二次元相関図上のデータの表示位置の調整を行った。次に、FL1及びFL2の二次元相関図上でPMT電圧電圧を調整し、図9（a）のような位置に蛍光集団が収まるように設定した。

【0065】まず、FL1及びFL2の二次元相関図上で、実施例1と同様にして蛍光値の補正を行った。次に、FL2及びFL3の二次元相関図においても同様に蛍光値の補正を行い、さらにFL1及びFL3の二次元相関図においても同様に蛍光値の補正を行った（図9（b））。補正が終了した蛍光集団の真の蛍光値は、記憶装置に記憶した。

実施例5

（4カラー蛍光補正）

【0066】まず、サンプルチューブにブランクビーズ、FITCビーズ、PEビーズ、PE-Cy5ビーズ

及びPE-Cy7ビーズを加えた。一方、データ収集画面上にて、FSC及びSSCの二次元相関図と、FL1及びFL2、FL2及びFL3、FL3及びFL4、FL2及びFL4から得られた二次元相関図を作成した。前記のサンプルをフローサイトメーターに流し、FSCのアンブゲイン及びSSCのPMT電圧電圧を調整し、FSC-SSC二次元相関図上のデータの表示位置の調整を行った。次に、FL1及びFL2の二次元相関図上でPMT電圧電圧を調整し、図1.0のような位置に蛍光集団が収まるように設定した。FL1、FL2及びFL3については実施例3と同様にして表示位置の調整を行い、さらにFL4についても調整を行った。蛍光値の補正は、図1.0に示すように、各蛍光集団が矢印の方向へ移動するように補正值の算出を行った。補正が終了した蛍光集団の真の蛍光値は、記憶装置に記憶した。

実施例6～7

(5カラー蛍光補正)

【0067】 先ず、サンプルチューブにブランクビーズ、FITCビーズ、PEビーズ、PE-Cy5ビーズ、PE-Cy7ビーズ及びAPCビーズを加えた。一方、データ収集画面上にて、FSC及びSSCの二次元相関図と、FL1及びFL2、FL2及びFL3、FL3及びFL4、FL2及びFL4、FL3及びFL5、FL4及びFL5それぞれの二次元相関図を作成した。ここで、FL2及びFL3の二次元相関図は図11に示したように、5つの蛍光集団が現れるようにFSCのアンブゲイン及びSSCのPMT電圧電圧、FSC-SSC二次元相関図上のデータの表示位置、及び、FL1及びFL2の二次元相関図上でPMT電圧電圧を調整した。

【0068】 ここで、5カラーを検出する方法としては、1stレーザーで4カラー、2ndレーザーで1カラーを検出する場合(実施例6)と、1stレーザーで3カラー、2ndレーザーで2カラーを検出する場合(実施例7)とがある。具体的には、前者では、FL3及びFL5の二次元相関図を用いて、1stレーザーでFITC(FL1)、PE(FL2)、PE-Cy5(FL3)、PE-Cy7(FL4)を検出し、2ndレーザーでAPC又はCy5(FL5)を検出し、特にFL5に漏れ込むFL3の値について補正する必要がある。また、後者ではFL3及びFL4の二次元相関図を用いて、1stレーザーでFITC(FL1)、PE(FL2)、PE-Cy5(FL3)を検出し、2ndレーザーでAPC(FL4)、APC-Cy7(FL5)を検出し、特にFL4に漏れ込むFL3の値について補正する必要がある。

【0069】 実施例8

(6カラー蛍光補正) 先ず、サンプルチューブにブランクビーズ、FITCビーズ、PEビーズ、PE-Cy5ビーズ、PE-Cy7ビーズ、APCビーズ及びAPC

-Cy7ビーズを加えた。一方、データ収集画面上にて、FSC及びSSCの二次元相関図と、FL1及びFL2、FL2及びFL3、FL3及びFL4、FL2及びFL4、FL3及びFL5、FL4及びFL6、FL5及びFL6それぞれの二次元相関図を作成した。

【0070】 ここで、6カラーを検出する方法としては、実施例6に示した1stレーザーで4カラー、2ndレーザーで1カラーを検出する際に、FL3及びFL5の二次元相関図の他に、FL5及びFL6、FL4及びFL6の二次元相関図を表示しつつ蛍光補正を行う。蛍光補正は、FL1-FL6の6つの蛍光色素から2つを選ぶ全組み合わせについて行った。各組での補正は実施例1～7と同様に行った。なお、蛍光補正は、少なくともFL1とFL2、FL3とFL4、FL5とFL6の3通りで行う必要があり、FL1～FL6から2つの蛍光色素を選ぶ組み合わせは15通りあるので3通り乃至15通りの組み合わせで補正を行えばよい。

【0071】 図12に、FSC-SSC(図12

(a))、FL1及びFL2(図12(b))、FL2及びFL3(図12(c))、FL3及びFL4(図12(d))、FL5及びFL6(図12(e))の二次元相関図をそれぞれ示した。また、図13(a)～図13(e)に、図12に示した二次元相関図それぞれについて蛍光補正を行った後の二次元相関図を示した。なお、図12及び図13に示す二次元相関図にかかる蛍光値の測定は6 μ mビーズを用いて行ったが、3 μ mビーズを用いて同様の試験を行った際にも同様の結果が得られた。

【0072】

【発明の効果】 以上説明したように、本発明の蛍光値補正方法、蛍光値補正装置、蛍光値補正プログラム及び前記蛍光値補正プログラムを記録した記録媒体によれば、複数の蛍光色素間や、複数のレーザー光を用いて蛍光の測定を行う際にも蛍光補正が可能であり、蛍光標識被験細胞の測定処理が終了した後も蛍光補正を実施することが可能である蛍光値補正方法、蛍光値補正装置、蛍光値補正プログラム及び当該プログラムを記録した記録媒体を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の蛍光値補正装置の一例を示すブロック図である。

【図2】 本発明の蛍光補正装置におけるデータの流れの一例を示すフローチャートである。

【図3】 本発明にかかる蛍光補正プログラムの処理の流れを示すフローチャートである。

【図4】 本発明にかかるPMT電圧調整プログラムの処理の流れを示すフローチャートである。

【図5】 本発明にかかる感度調整プログラムの処理の流れを示すフローチャートである。

【図6】 本発明にかかるファイル保存・呼び込みプログ

19

ラムの処理の流れを示すフローチャートである。

【図7】本発明にかかるデータベース管理プログラムの処理の流れを示すフローチャートである。

【図8】(a)～(c)は、蛍光標識被験細胞をフローサイトメーターによって検出して得られた二次元相関図の一例である。

【図9】(a)～(b)は、蛍光標識被験細胞をフローサイトメーターによって検出して得られた二次元相関図の一例である。

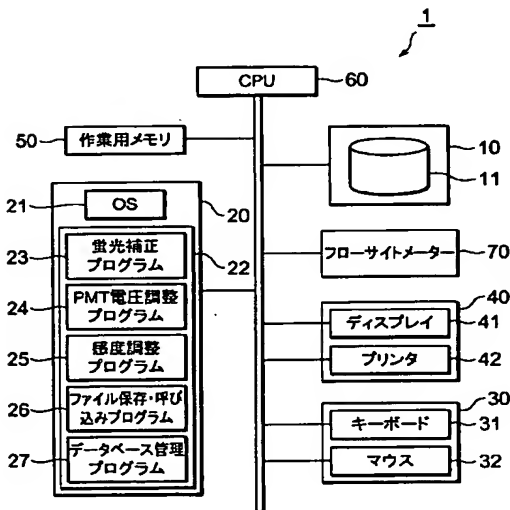
【図10】蛍光標識被験細胞をフローサイトメーターによって検出して得られた二次元相関図の一例である。

【図11】蛍光標識被験細胞をフローサイトメーターによって検出して得られた二次元相関図の一例である。

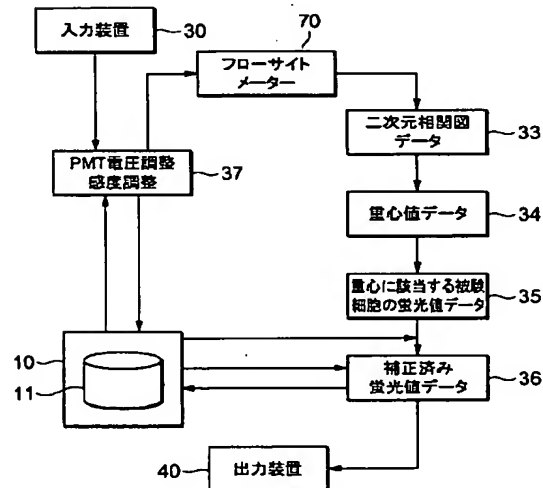
【図12】(a)～(e)は、蛍光標識被験細胞をフローサイトメーターによって検出して得られた二次元相関図の一例である。

【図13】(a)～(e)は、蛍光標識被験細胞をフロ*

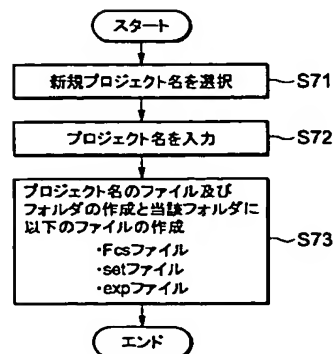
【図1】



【図2】



【図7】



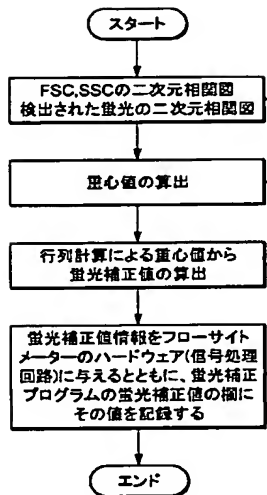
20

*ーサイトメータによって検出し、蛍光値の補正を行って得られた二次元相関図の一例である。

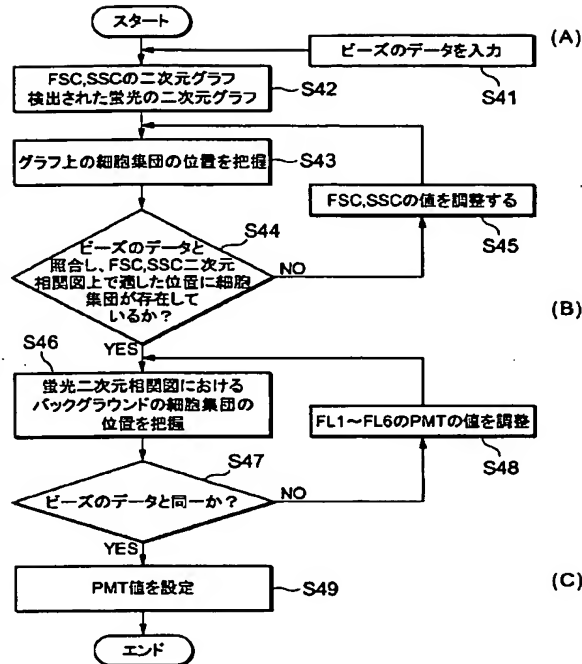
【符号の説明】

1…蛍光値補正装置、10…第1記録装置、11…自動蛍光補正測定フォルダ、20…第2記録装置、21…オペレーティングシステム、22…自動蛍光補正プログラム、23…蛍光補正プログラム、24…PMT電圧調整プログラム、25…感度調整プログラム、26…ファイル保存・呼び込みプログラム、27…データベース管理プログラム、30…入力手段、31…キーボード、32…マウス、33…二次元相関図データ、34…重心値データ、35…重心に該当する被験細胞の蛍光値データ、36…訂正済み蛍光値データ、37…PMT電圧調整・感度調整、40…出力手段、41…ディスプレイ、42…プリンタ、50…作業用メモリ、60…CPU、70…フローサイトメーター

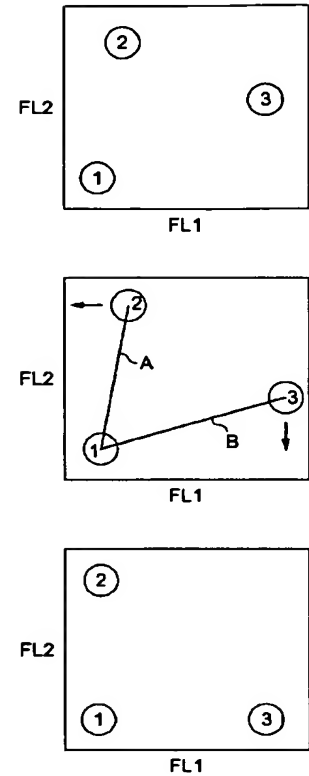
【図3】



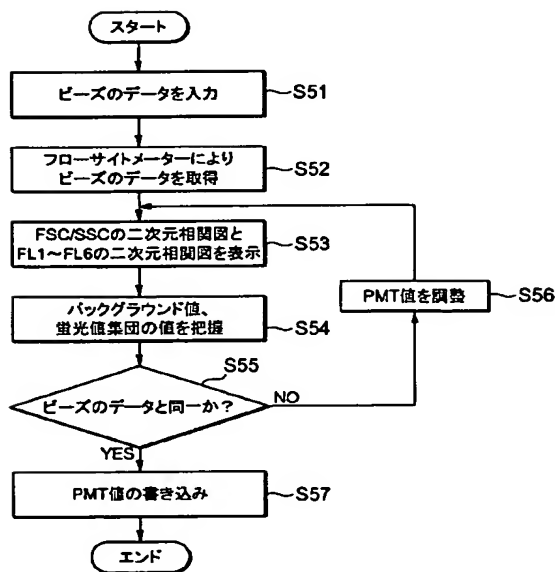
【図4】



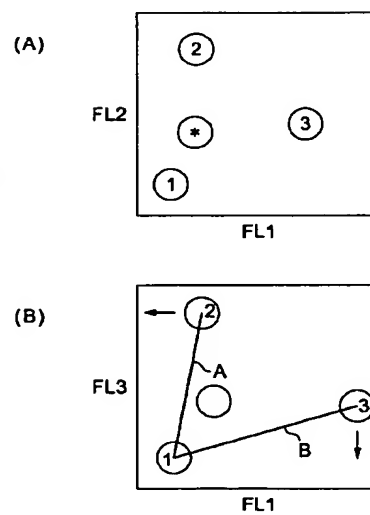
【図8】



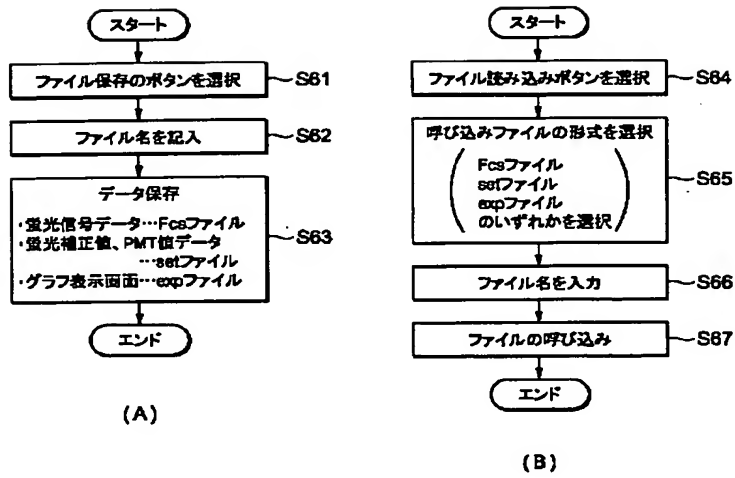
【図5】



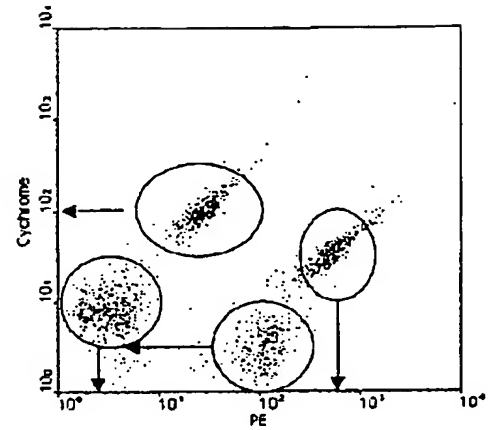
【図9】



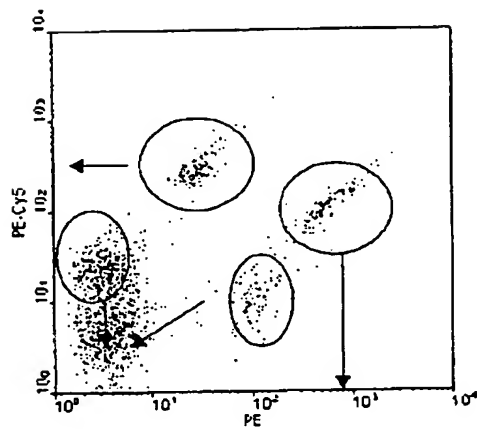
【図6】



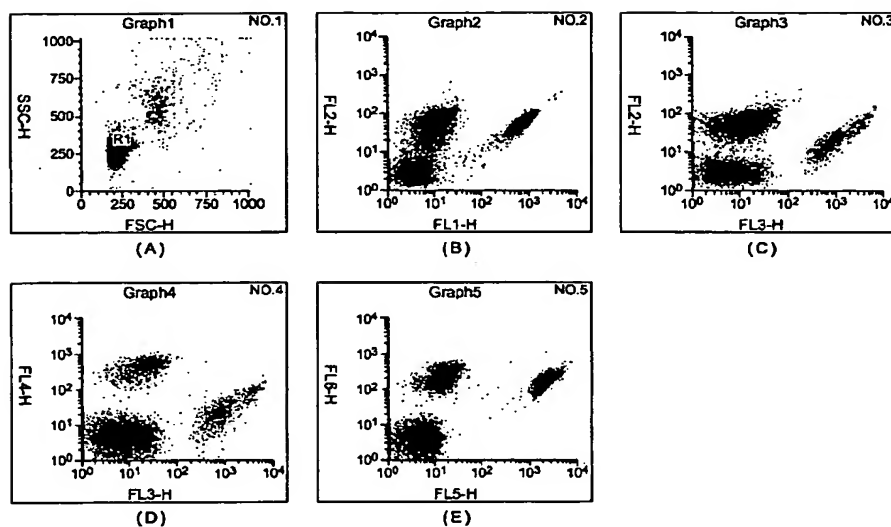
【図10】



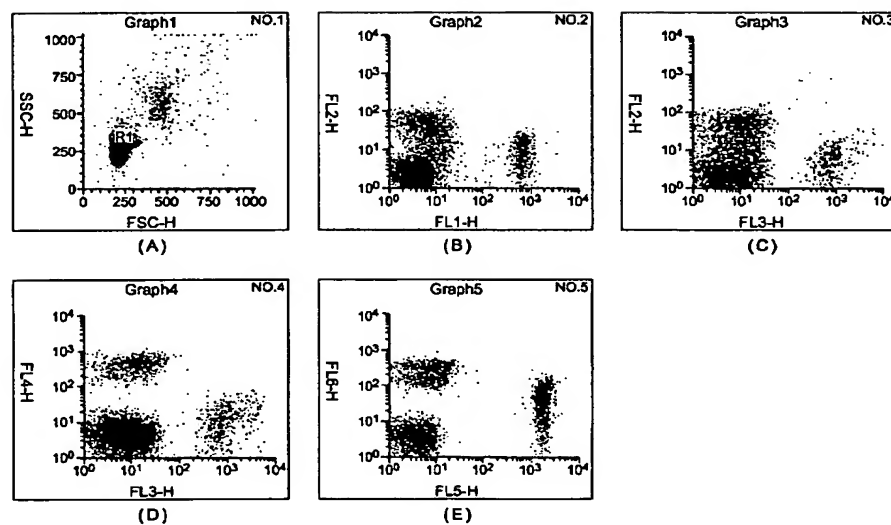
【図11】



【図12】



【図13】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.
G 0 1 N 33/58

識別記号

F I
G 0 1 N 33/58

テーマコード(参考)

Z

F ターム(参考) ZC043 AA03 BA16 DA02 EA01 KA09
LA01 LA02 MA01 NA01 NA02
NA05 NA06 NA13
ZC045 AA02 AA24 CA01 CB01 FA11
FA37 FB07 FB12 GC15 JA01
JA02